

申请号: 94105930.8 公开号: CN 1099799A

## 制备和纯化 $\alpha$ -干扰素的方法

Method of preparation and purification of IFN- $\alpha$

### Abstract:

The present invention relates to a new method for preparing recombinant IFN- $\alpha$ . It was produced by E.Coli under control of PhoA promoter. Connecting gene of IFN- $\alpha$  to STII signal sequence, the protein will be localized in periplasmic space and have correct N-terminal. Purification of the protein include following processes: silica gel absorbing chromatograph, hydrophobic exchange chromatograph, cation and anion exchange chromatograph.





# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94105930.8

[51]Int.Cl<sup>5</sup>

C12N 15/70

[43]公开日 1995年3月8日

[22]申请日 94.5.26

[30]优先权

[32]93.5.26 [33]DE[31]P4317459.0

[32]93.9.3 [33]DE[31]P4329756.0

[71]申请人 贝林格尔-英格海姆国际有限公司

地址 联邦德国英格海姆

[72]发明人 鲁道夫·豪普特曼 埃德加·福克纳

格哈特·博多 蒂尔曼·沃斯

莫格里德·莫勒-福吉

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

C12N 15/21

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 制备和纯化 $\alpha$ -干扰素的方法

[57]摘要

本发明涉及制备重组 IFN- $\alpha$  的一个新方法。表达在 PhoA 启动子控制下在 E.Coli 中进行。通过使 IFN- $\alpha$  基因和 STII 信号序列连接,使蛋白质分泌到外周胞粒空间且得到正确加工的 N-末端。并通过以下方法进行蛋白质纯化,即硅胶吸附层析法、疏水交换层析法、阳离子和阴离子交换层析法。

- 1、通过在E.coli中表达制备 $\alpha$ -干扰素的方法，其特征在于：
  - a)  $\alpha$ -干扰素在含有载体的细胞中被表达，载体中E.coli的热稳定肠毒素II (STII) 的基因的信号序列与为成人 $\alpha$ -干扰素编码的序列相连接；
  - b) 分离被表达的 $\alpha$ -干扰素。
- 2、权利要求1的方法，其特征在于该载体还包含来自E.coli的碱性磷酸酯酶 (phoA) 启动子。
- 3、权利要求1至2的方法，其特征在于该载体还包括STII基因的核蛋白体连接位点的序列。
- 4、权利要求1至3的方法，其特征在于该干扰素的分离包括下述步骤：
  - a) 硅胶吸附层析；
  - b) 疏水相互作用层析；
  - c) 阳离子交换层析；
  - d) 阴离子交换层析。
- 5、权利要求4的方法，其特征在于疏水相互作用层析在苯基琼脂糖凝胶上进行。
- 6、权利要求4的方法，其特征在于阳离子交换层析在磺丙基离子交换剂上进行。
- 7、权利要求4的方法，其特征在于阴离子交换层析在DEAE-琼脂糖凝胶上进行。
- 8、权利要求1至7的方法，其特征在于 $\alpha$ -干扰素是干扰素

-  $\alpha$  2。

9、权利要求8的方法，其特征在于干扰素 -  $\alpha$  2 包含如下氨基酸序列：

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr  
Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser  
Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu  
Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu  
His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys  
Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe  
Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys  
Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys  
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile  
Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp  
Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser  
Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

10、纯化  $\alpha$  - 干扰素的方法，其特征在于该方法包括如下步骤：

- a) 硅胶吸附层析；
- b) 疏水相互作用层析；
- c) 阳离子交换层析；
- d) 阴离子交换层析。

11、权利要求10的方法，其特征在于该疏水相互作用层析是在苯基琼脂糖凝胶上进行。

12、权利要求10的方法，其特征在于该阳离子交换层析是在磺丙基离子交换剂上进行。

13、权利要求10的方法，其特征在于该阴离子交换层析在DEAE-琼脂糖凝胶上进行。

14、权利要求10至13的方法，其特征在于该  $\alpha$  - 干扰素是细菌

表达的。

15、权利要求10至14的方法，其特征在于该 $\alpha$ -干扰素是 $\alpha 2$ -干扰素。

16、权利要求15的方法，其特征在于该 $\alpha 2$ -干扰素包含如下氨基酸序列：

Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr  
Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser  
Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu  
Phe Gly Asn Gln Phe Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu  
His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys  
Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe  
Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys  
Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys  
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile  
Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp  
Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser  
Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

17、用于在E. coli中表达 $\alpha$ -干扰素的载体，其特征在于该载体包含与为成人 $\alpha$ -干扰素编码的序列相连的STII基因的信号序列。

18、权利要求17的载体，其特征在于该载体还含有phoA启动子。

19、权利要求17至18的载体，其特征在于该载体还含有STII基因的核蛋白体结合位点。

20、权利要求17至19的载体，其特征在于该干扰素- $\alpha$ 是干扰素- $\alpha 2$ 。

21、权利要求17至19的载体，其特征在于它含有如下的核苷酸序列：

TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC  
 TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC  
 TGC TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG  
 TTT GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC  
 CAT GAG ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG  
 GAC TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC  
 TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT  
 GTG ATA CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG  
 GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC  
 ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG  
 GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA  
 ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA

或是与该序列具有70%以上同源的序列，且用于干扰素- $\alpha$ 的编码。

22、权利要求21的载体，其特征在于该载体含有如下的核苷酸

序列：GAATTCGAGATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCGCAAAATGACCAACAG  
 CGGTTGATTGATCAGGTAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGCCCGATGCCAGCATT  
 CCTGACGACGATACGGAGCTGCTGCGCGATTACGTAAAGAAGTTATTGAAGCATCCT  
 CGTCAGTAAAAAGTTAATCTTTTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTACGGCCGAGACT  
 TATAGTCGCTTTGTTTTTTATTTTTTAATGTATTTGCTCGAGAGGTTGAGGTGATTTT  
 ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT ATG TTC GTT  
 TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT CTG CCT CAA  
 ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA  
 CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG AAG GAC AGA  
 CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC  
 CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG  
 CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT  
 TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC  
 CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG  
 GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG  
 GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA  
 GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA  
 GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA  
 AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGATAACGATCGTAACTGCA

23、应用权利要求17至22之一的载体于制备干扰素- $\alpha$ 。



制备和纯化 $\alpha$ -干扰素的方法

本发明涉及通过细菌表达制备 $\alpha$ -干扰素(IFN $\alpha$ )的方法及其分离, 还涉及用于此目的表达载体, 及纯化IFN $\alpha$ 的方法。

通过细菌表达制备IFN $\alpha$ 的方法是已知的。常规方法基于大肠杆菌(*E. Coli*)中蛋白质的细胞质表达, 其中被表达的IFN $\alpha$ 或以所谓的内含体以不溶的形式存在于细胞中, 或在细胞壁打开后被发现于可溶的部分(Thatcher et Panayotatos, 1986; Goeddel 等人, 1980; Dworkin-Rastl等, 1983)。但是, 细胞质表达具有一些缺陷。合成的蛋白不能正确折叠且因为在细胞质中还原性条件占优势, 使其不含有必要的二硫桥键。因此形成的IFN $\alpha$ 不得不在制备过程中被氧化然后再折叠。这一方法是低效的且导致不需要的副产物。(全部或部分的还原形式, 由分子间二硫桥键产生的低聚物, 通过假二硫桥键的形成而错误折叠的形式), 这些副产物难于分离去除。另一个问题是作为转录起点的N-末端蛋氨酸只能部分地从细胞内合成的IFN $\alpha$ 上裂解掉。所得的N-Met-IFN $\alpha$ 几乎不能从原来的IFN $\alpha$ 上除去。

该常用方法的另一个缺点是需用启动子, 其在非诱导状态不能完全关闭, 必须通过添加化学试剂诱导且在诱导状态表达速度不理想。比如来自*Serratia marcescens*的色氨酸启动子(trp-promotor)。

为了克服上述的一些缺点, 并利用经济的*E. coli*系, Breitling

等试图利用能使干扰素分泌通过细胞膜至外周胞粒空间中的载体表达IFN $\alpha$  1和IFN $\alpha$  1/2杂种。他们利用来自一种菌体的启动子、核糖体结合位点(RBS)和链激酶基因(sak42D)的信号序列。所产生的60%~80%的IFN $\alpha$ 被分泌到外周胞粒空间中。然而,由于载体结构的原因,该蛋白质含有N-末端氨基酸,而这些氨基酸在相对应的原IFN $\alpha$ 中不出现。这一表达系统的严重缺陷是转化成该结构的菌株不能保持遗传上的稳定;表达盒通过IS1的自发插入而失活。在现有技术中用E.Coli提供表达/分泌系统来制备人IFN $\alpha$ 的目标尚未实现。

已知成功地在E.Coli中表达人生长因子受体的表达/分泌盒是来自碱性磷酸激酶(PhoA)启动子和热稳定的肠毒素II(STII)信号序列的结构。(Fuh等,1990)。

在E.Coli上生产重组体IFN $\alpha$ 的另一个问题是细菌溶菌产物中蛋白质的纯化。已知有一些方法(Thatcher和Panayotatos,1986;EP-A 203 382)。为了得到蛋白质的原始折叠,优选使用不要求变性或沉淀步骤的方法。这种方法描述于EP-A 396 555中。它包括如下步骤:免疫亲和层析、反相层析(RPC)、阳离子交换层析、超滤浓缩及凝胶过滤层析。该方法与其它已知方法相似的是基于第一步骤的免疫亲和层析的高度选择性。对于制备高纯度的IFN $\alpha$  1,特别是IFN $\alpha$  2,尚没有不用变性/沉淀步骤和免疫亲和层析的方法。同时,该方法因经济和技术原因是理想的。因为免疫亲和层析需要单克隆抗体,所以费用很高,并且,因为抗体-偶联的基质的存活期有限,需要不断供应这些抗体。

本发明的目标是建立一种更经济更有效的方法,通过在E.Coli中的重组体表达,用来制备干扰素 $\alpha$ ,特别是干扰素 $\alpha$  2。同时,需

要建立一有效且稳定的系统用于蛋白质到外周胞粒空间或培养基的表达/分泌。进而，建立一种温和地高度纯化被表达的蛋白质的方法，该方法不包括变性/沉淀步骤且不需免疫亲和层析。

本发明已解决了这个问题。本发明通过构成一种载体来建立从 E. coli 制备 IFN $\alpha$  的稳定的表达/分泌系统。该载体含有 E. coli 的热稳定肠毒素 II (STII) 信号序列 (先导序列)，其与成人干扰素 -  $\alpha$ ，优选与干扰素 -  $\alpha$  2 的密码序列连接。表达控制优选用 E. coli 的碱性磷酸激酶 (phoA) 启动子的方式影响。本发明另一优点是整合 STII 基因的核糖体连接位点。本发明另一个令人惊异的进步是建立了纯化  $\alpha$  干扰素的方法，包括以下步骤：硅胶吸附层析，疏水相互作用层析 (HIC)，阳离子交换层析和阴离子交换层析。

本发明的一方面涉及通过用转化细菌细胞的细菌表达及分离被表达的 IFN $\alpha$  来制备 IFN $\alpha$  的方法。该转化细菌细胞中含有一种表达载体，其中的 STII 信号序列与一种 IFN $\alpha$  基因连接。本发明的另一方面，涉及用于制备 IFN $\alpha$  的细菌表达载体及该载体制备 IFN $\alpha$  的用途，该载体包含来自 STII 基因和一种 IFN $\alpha$  基因的构成。本发明的第三个方面涉及通过硅胶吸附层析，疏水相互作用层析，阳离子和阴离子交换层析的层析步骤制备 IFN $\alpha$  的方法。

构成载体的起始点可以是 E. coli 中可复制的质粒，比如质粒 pAT153 (Twigg 等, 1980)，其特别适合用于此目的。为 STII 基因的信号肽编码的核苷酸序列是本领域已知的 (Picken 等, 1983; Lee 等, 1983)。本领域的普通技术人员用突变 (替代、缺失、插入、添加) 手段制备这一序列的变型，但并不改变其基本性质，特别是制备核酸序列，该序列因为基因密码的简并而给信号肽的相同氨基酸

序列编码(Sambrook等, 1989, 特别是第15章)。用于IFN $\alpha$ 族(IFN $\alpha$  family)成员编码的完整序列是已知的(Mantei等, 1980; Streuli等, 1980; Goeddel等, 1981); 编译它们的同源基因多于70%。这些序列的其它变型天然存在或从已知序列用已知的方法通过突变基因法来制备(Sambrook等, 1989, 特别是第15章)。本发明中

“IFN $\alpha$ ”一词除已知序列外, 还包括其它一些变型, 它们的特征在于与已知序列高度同源, 且为生物活性的IFN $\alpha$ 编码。特别优选的是IFN $\alpha$  2c编码序列(Dworkin等, 1983; Bodo和Fogy, 1985)。特别优选使用phoA-启动子进行控制表达而且整合STII基因的核蛋白体结合位点是有利的。phoA-启动子的序列(Chang等, 1986; Shuttleworth等, 1981)和STII核蛋白体结合位点的序列(Picken等, 1983; Lee等, 1983)是已知的。本领域的普通技术人员从这些序列也能容易地制成相当的变型。载体的构建、合适E.coli菌株的转化、发酵和提取可用已知方法进行。参见(Sambrook等, 1989)。例如, E.coli菌株W3110(E.coli k12野生型 $f^+ \lambda^-$ , IN(rrnD-rrnE)1)非常适合用于表达。基础培养物可以令人满意地在LB培养基中产生, 并通过控制氧和营养物的供给, 可制备主培养物, OD<sub>546</sub>至多为250~280。一种被证明是合适的提取方法, 包括借助匀浆器, 将酸-失活的生物物质(biomass)悬浮于稀醋酸中, 加入聚乙烯胺, 优选浓度为0.25% (w/v), 调节混合物至碱性pH, 优选pH 10, 搅拌混合物并通过离心除去菌体。纯化可以用已知方法进行, 参见(Thatcher和Panayotatos, 1986; EP-A 203 382)。但是, 一种包括四个层析步骤的方法, 即硅胶吸附层析、疏水相互作用层析、阳离子和阴离子交换层析, 被证明是特别有利的。由Grace出品的953W型硅胶特别

适用于硅胶层析的凝胶层，同时，缓冲液500~1500 mM四甲基铵氯化物 (TMAC)，优选800 mM TMAC，利于用作洗脱液。对于疏水相互作用层析，苯基琼脂糖作为凝胶支持物被证明是适合的。优选在20%硫酸铵存在下上样，柱用含30%硫酸铵的缓冲液饱和。IFN $\alpha$ 用最终浓度为30%乙二醇的线性梯度洗脱。阳离子交换层析可以用磺丙基离子交换树脂。在pH 3~5时，优选pH 3时上样，柱预先饱和至pH 5。使用加10%乙二醇的线性梯度的食盐洗脱IFN $\alpha$ 。阴离子交换层析中优选含有DEAE-琼脂糖的支持物且上样和洗脱在pH 5.5至6.0时进行，优选pH 5.8。加0.1%吐温20的线性梯度的食盐特别适于作洗脱剂。本领域的普通技术人员基于相同分离原则用相当的材料替代一种或多种凝胶材料是可能的，并不具有创造性，而且这样做是采用与本发明方法等同的方法。

令人惊异的是，通过将STII信号序列和IFN $\alpha$ 基因连接，可以建立一稳定的表达/分泌系统，这对利用前述的sak42D先导/IFN $\alpha$ 重组是不可能的。已证明在phoA启动子控制下对这一序列进行表达是特别成功的。在这一点上，STII基因的核蛋白体结合位点的整合也证明是有优势的。通过控制培养基中的磷酸浓度可以控制表达

(磷酸缺乏可激活phoA启动子)；在不活跃状态下不存在能检测到的基本表达(basal expression)。不需要加入其它化学物品将其激活，在活化状态表达率很高。合成的蛋白质大量分泌到外周胞粒空间中。分泌的蛋白质正确折叠，其含有真正的N-末端和正确的二硫桥键。在E. coli W3110中表达的SDS凝胶分析表明30~50%的合成的IFN $\alpha$ 被正确加工，这相当于所有被分泌的蛋白质。

使用实施例3所描述的提取方法，可以提取到生物物质中检测

到的所有IFN $\alpha$  2c的 $29.3 \pm 5.9\%$ 。这相当于操作水平的30~50%

(这可被观察到)。基于蛋白质的总量自生物物质中提取的物质含有 $4.5 \pm 1.8\%$  IFN $\alpha$  2c。硅胶吸附层析形成IFN $\alpha$  2c池, 平均纯度为 $16.7 \pm 4.4\%$ 。苯基琼脂糖层析收率为 $93.3 \pm 7.3\%$ , 得到的IFN $\alpha$  2c纯度是 $71.2 \pm 15.5\%$ 。磺丙基离子交换层析收率为 $70.9 \pm 14.8\%$ , 纯度为 $97.6 \pm 4.6\%$ 。最后一步, 即DEAE离子交换层析, 得到纯度100%的IFN $\alpha$  2c, 收率为 $86.9 \pm 9.2\%$  (详细阐述见下文)。6种不同纯化方法的数据列于表1 (产率) 和表2 (IFN $\alpha$  2c含量) 中。图3表明每一纯化步骤的层析特征。

从1Kg的生物物质中, 得到 $340 \pm 100$  mg 的纯化的IFN $\alpha$  2c。纯化过程的收率是 $56.1 \pm 22.2\%$ 。基于生物物质中IFN $\alpha$  2c的含量, 总收率是14.4%。这些数据列于表3中。图4 表明纯化的IFN $\alpha$  2c的一个典型SDS - PAGE, 在最后层析步骤中洗脱。IFN $\alpha$  2c的18 kDa带是唯一可见的带。未观察到污染带。图5A表明一个典型的反相HPLC层析。纯化的IFN $\alpha$  2c在24.8分钟作为一单峰洗脱。当这种物质用平缓的乙腈梯度(图5B)洗脱时, 在主峰的两侧各观察到2 个污染峰。这些含有IFN $\alpha$  2c总量1.8%左右的肩峰, 表示蛋氨酸111被氧化的形式 (第一个肩峰) 或N-末端乙酰化的形式 (第二个肩峰)。

表1: 以不同纯化步骤后所得的IFN $\alpha$  2的百分比表示不同纯化步骤的收率。表中显示的是6种不同生物物质的6种不同纯化过程(P1~P6)。最后两栏是平均值(M)和标准偏差(sd)。

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	M	sd
萃取物	37.9	24.0	34.3	30.7	29.1	20.0	29.3	5.9
硅胶	62.0	95.8	88.2	99.5	74.1	81.0	83.4	12.8
苯基	100.0	82.2	85.9	100.0	100.0	91.0	93.2	7.3
磺丙基	64.0	54.3	76.5	100.0	60.0	71.0	70.9	14.8
DEAE	95.0	100.0	83.5	88.2	84.0	71.0	86.9	9.2

表2: 不同纯化步骤的IFN $\alpha$  2的含量。如同表1, 这些数据是以基于在该纯化步骤中得到的蛋白质总含量的IFN $\alpha$  2含量的百分比来表示。

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	M	sd
萃取物	8.0	2.1	4.1	4.7	3.6	4.4	4.5	1.8
硅胶	12.9	11.6	15.7	15.7	19.4	15.6	16.7	4.4
苯基	76.6	43.3	62.9	62.9	80.0	93.5	71.2	15.5
磺丙基	98.5	87.3	100.0	100.0	100.0	100.0	97.6	4.6
DEAE	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0

表3: 纯化过程的总收率。生物物质中IFN $\alpha$  2c的含量以每千克生物物质中IFN $\alpha$  2的克数(g)表示。加工和萃取以IFN $\alpha$  2总量的百分比表示。纯化的收率以IFN $\alpha$  2c相对于萃取物的IFN $\alpha$  2含量的百

分比表示。总收率以每千克(kg)生物物质中获得的IFN $\alpha$  2的毫克数(mg)表示并基于萃取物的IFN $\alpha$  2c含量, 以纯化后的IFN $\alpha$  2c的百分比表示。

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	M	sd
生物物质 [g/kg]	1.4	1.0	1.1	1.5	1.1	1.8	1.3	0.2
加工[%]	50	40	40	40	20	40	38.3	8.9
萃取[%]	37.9	24.0	34.3	30.7	29.1	20.0	29.3	4.7
纯化[%]	39.7	42.7	57.9	90	44.5	52.3	56.1	22.2
总产率[mg]	538	206	366	480	280	258	340	120
总产率[%]	14.3	20.3	16.6	23.9	10.9	7.4	14.4	6.9

附图说明:

图1A: pCF2的基因图。pAT153的EcoRI-BamHI片段被IFN- $\omega$  1表达盒代替。

图1B: EcoRI (被损坏的) - BamHI部分的序列, 其包含phoA-启动子, STII先导子 + IFN $\omega$  1基因。

图2A: 质粒pDH13的基因图。pAT153的SspI-PstI片段被IFN $\alpha$  2c表达盒(2B的EcoRI-PstI片段) 代替。 $\beta$ -内酰胺酶基因被损坏。

图2B: 插入pDH13的EcoRI-HindIII的核酸序列。

图3A至图3D: 从生物物质提取的IFN $\alpha$  2c的层析纯化。



图3A: 硅胶吸附层析。箭头指明用800 mM 氯化四甲基铵洗脱。

图3B: 苯基琼脂糖疏水相互作用层析。用0~100%的线性梯度的溶剂B洗脱, 如虚线(----)所示。

图3C: 磺丙基阳离子交换层析。用0~100%梯度的溶剂B进行洗脱, 如虚线所示。

图3D: DEAE琼脂糖阴离子交换层析。用0~100%梯度的溶剂B洗脱, 如虚线所示。

在图3A至图3D的每一层析图主峰下面的横线表明含有IFN $\alpha$  2的池, IFN $\alpha$  2被收集并用于后续步骤。

图4: 纯化的IFN $\alpha$  2c的SDS-PAGE (用考马斯亮蓝染色)。左边的数字表示标准蛋白质的分子量。

痕迹1: 标准IFN $\alpha$  2c,

痕迹2: 3  $\mu$ g IFN $\alpha$  2c,

痕迹3: 6  $\mu$ g IFN $\alpha$  2c,

痕迹M: 分子量标准。

图5A和图5B: 用反相HPLC纯化的IFN $\alpha$  2c的特征。

图5A: 在24分钟内, 用20~68%的线性梯度溶剂B洗脱IFN $\alpha$  2c。

图5B: 在30分钟内, 用45~53%的线性梯度溶剂B洗脱IFN $\alpha$  2c。

实施例1: 表达载体pDH13的制备及细胞的转化

一般方法:

按Sambrook等描述的方法(1989)进行下列标准操作: 用限制性核酸内切酶对DNA限制性消化, 填充反应, 苯酚提取及DNA沉淀, 琼脂糖凝胶电泳及从琼脂糖凝胶洗脱DNA, DNA分子的连接, 细菌的转化及从细菌分离质粒。

质粒:

pCF2 pCF2是从质粒pAT153制备的(Twigg等, 1980)。它包含来自E. coli的碱性磷酸酯酶的启动子(phoA, Chang等, 1986; Schuttleworth等, 1986), 及STII先导肽的编码区(Picken等, 1983; Lee等, 1983)和人体基因IFN $\omega$ 1 (Hauptmann等, 1985)。图1A和图1B表示pCF2的基因图和相关部分的序列。

pER21/1 pER21/1是用于IFN $\alpha$  2c的一种细菌表达载体(European Patent Specification 0 115613)。

低聚糖 (5'  $\rightarrow$  3'):

EBI-2787: CGTCTTCAAGAATTCGAGATTATCG

EBI-2799: GGCAGATCACATGCATAGGCATTTGTAGCAATAG

EBI-2798: ATGCCTATGCATGTGATCTGCCTCAAACCCACAGC

EBI-2797: GACTTCAGAAGCTTCTGCAGTTACGATCGATCGTTATCATTCC  
TTACTTCTTAACTTTC

在一个二步PCR中, 通过phoA启动子、IFN $\alpha$  2c序列及STII先导序列进行表达盒的制备

pER21/1 DNA用HindIII进行线性化, pCF2-DNA用PvuI线性化。所用方法在下文称为SOE-PCR (“Splicing by overlap extension (通过重叠延伸进行拼接)”, Ho等, 1989)。

PCR1a (IFN $\alpha$  2c基因的放大): 100 ng 线性化的pER21/1 DNA, 25 pmol (EBI-2797和25 pmol EBI-2798在50  $\mu$ l 的缓冲液中用Perkin Elmer Cetus 热循环仪TC-1进行热循环, 该缓冲液包括50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% 明胶,

0.2 mM dATP, 0.2 mM dGTP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dTTP和1.25 单位的Taq聚合酶。94℃下培养3分钟后, 进行10次循环 (第1阶段: 在94℃下40秒, 第2阶段: 在55℃下30秒, 第3阶段: 在72℃下90秒)。

PCR1b (phoA启动子放大后加上STII先导序列): 100 ng 的线性的pCF2-DNA, 25 pmol EBI 2787和25 pmol EBI 2799 按PCR1a项下所描述的相同的缓冲液及相同条件下, 进行热循环。

所得到的PCR1a(540bp)和PCR1b(374bp)的DNA片段用凝胶纯化 (在TBE缓冲液中, 1.2% 低凝胶型琼脂糖, 1XTBE: 10.8 g Tris/l, 5.5 g 硼酸/l, 0.93 g EDTA/l)。含有该DNA片段的琼脂糖段被切下, 通过加入100  $\mu$ l 的H<sub>2</sub>O并加热至70℃将琼脂糖融化。

PCR2: 将琼脂糖/DNA溶液各5 ml 混合, 并在100  $\mu$ l 含有50 pmol的EBI-2787和EBI-2797的溶液中进行热循环。缓冲液与PCR1a项下的相同。热循环装置受程序控制, 以便在94℃下5分钟的延迟期后接20个循环 (第一步: 在94℃下40秒, 第二步: 在55℃下30秒, 第三步: 在72℃下5分钟; 第三步在每一新的循环中延长5秒钟)。放大的DNA通过苯酚/氯仿抽提及乙醇沉淀进行纯化。将该PCR产物溶解并在相应的缓冲液中用HindIII和EcoRI剪切。

PCR产物(pDH9)的克隆

Bluescribe M13<sup>+</sup> (Stratagene, 圣地亚哥, CA, USA) 用HindIII和EcoRI双剪切, 大的片段用1.2%的琼脂糖凝胶进行凝胶纯化。10 ng 的Bluescribe M13<sup>+</sup> DNA和用EcoRI/HindIII剪切的50 ng 的PCR产物在10  $\mu$ l 的溶液中连接, 该溶液包含50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM 二硫苏糖醇, 1 mM ATP, 50  $\mu$ g/ml牛血清白蛋白(BSA), 及2个单位的T4-DNA-连接酶(NEN),

在0℃下进行1小时，室温下进行3小时。8  $\mu$ l 的该溶液用于JM101菌株 (*E. coli* K12, SupE, thi,  $\Delta$ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIZ $\Delta$ M15]) 的感受态的*E. coli*细胞的转化。

选择一个克隆，分离出DNA，并将表达盒进行序列化。该序列与理论上期望的序列严格一致（图2A和B），质粒指定为pDH9。

#### 表达质粒pDH13的构建

pAT153用SspI和PstI双剪切，分离出大的片段。pDH9用EcoRI剪切，末端用DNA聚合酶1的Klenow片段和4dNTPs填充，线形pDH9-DNA经苯酚抽提和沉淀后，该DNA用PstI剪切，含有phoA启动子的片段、STII先导序列及IFN $\alpha$  2c基因从1%琼脂糖凝胶分离。

10 ng 的pAT153 $\times$ SspI $\times$ PstI和30 ng 的含有表达盒的片段在10  $\mu$ l 溶液中连接，室温下进行5小时。5  $\mu$ l 的该混合物用于使菌株HB101的感受态的*E. coli*菌转化，转化的菌体的选择在含用10  $\mu$ g/ml 四环素的LB琼脂板上进行（10g胰蛋白胨/l，5 g 酵母抽提物/l，5 g NaCl/l，15 g 适于菌体生长的琼脂/l。pDH13的基因图和相关区域的序列示于图2A和B中。

从如此制得的各种克隆中分离质粒DNA，并通过限制分析确认其正确组成。选择出一种质粒并指定为pDH13。质粒pDH13用于转化*E. coli* W3110 (*E. coli* K12野生型, f', r', IN(rrnD-rrnE)1)。

#### 实施例2: 发酵

##### 初级培养

从储存的培养物中取出700 ml 含有5 mg/l 四环素的高压灭菌后的LB培养基（10 g 适于菌体生长的胰蛋白胨/l，5g适于菌体生长的酵母抽提物/l，10 g NaCl/l，pH 7.0）在2升玻璃容器中培养，

以得到 $OD_{546}$ 为0.01。培养物在 $37^{\circ}\text{C}$ 下培养10小时，伴随剧烈搅拌(800 rpm)及通气(每分钟5个发酵罐体积[vvm])

主培养

培养基的组成

在发酵罐中：

- 1.21 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- 3.96 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 6.53 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- 1.23 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.32 g/l NaCl
- 0.25 g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 1.0 g/l 柠檬酸三钠 $\times 2\text{H}_2\text{O}$
- 1.0 ml/l 微量元素浓缩物
- 12.5 g/l 葡萄糖
- 20 mg/l 盐酸硫胺
- 50 mg/l L-色氨酸
- 100 mg/l L-亮氨酸
- 50 mg/l L-蛋氨酸
- 5 mg/l 四环素

微量元素浓缩物 (每100 ml 的量)

- 3.35 g  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 1.09 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.267 g  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 0.267 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

0.221 g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

0.333 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$

1.37 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

10 ml 浓HCl

加水至100 ml

在发酵过程中的补料:

(基于发酵罐体积的量)

350 g/l 葡萄糖

3.70 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

175 mg/l 盐酸硫胺

0.50 g/l L-色氨酸

4.0 g/l L-亮氨酸

2.0 g/l L-蛋氨酸

发酵过程中消泡剂的计量加入:

(基于发酵罐的体积)

1.0 mg/l UCON LB625

盐类 ( $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$

及柠檬酸钠) 在发酵罐中灭菌。冷却后, 无菌操作加入痕量元素、 $\text{MgSO}_4$ 、葡萄糖、硫胺、L-色氨酸、L-亮氨酸、L-蛋氨酸及四环素, 得到7升起始体积。600 ml 的基础培养物被自动接种至发酵罐。发酵条件是: 搅拌速率为1000rpm, 通气1vvm, 罐压为0.3巴, 温度为 $37.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , pH值用 $\text{NH}_3$ 和 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 保持在 $6.7 \pm 0.1$ 。必要时溶解氧的浓度可通过通入富氧空气 (在罐压为0.3巴时) 使之保持在15%空气饱和度以上。当起始存在的葡萄糖消耗完后, 开始补料过程,

该过程通过氧浓度和所含的葡萄糖、硫胺、 $\text{MgSO}_4$ 、L-色氨酸、L-亮氨酸及L-蛋氨酸来自动引发。补料速率开始为2.5 g/l/h, 随后在24小时内连续增至5.0 g/l/h, 并保持稳定至发酵过程结束。

当350 g/l总量的葡萄糖全部被加入后, 发酵终止。此时在546 nm 具有250至280的特征光密度。

为了使生物物质失活, 混合物冷至约 $10^\circ\text{C}$ , 同时, pH用 $\text{H}_2\text{SO}_4$ 调至2.0, 通过离心分离出生物物质并于 $-70^\circ\text{C}$ 冷藏。

### 实施例3: 萃取

酸-失活生物物质 (约0.5 kg) 用Polytron匀浆机使之混悬于500 ml 的1%醋酸中, 该混合物在 $0^\circ\text{C}$ 搅拌1小时。加入聚乙烯亚胺 (50% 储备溶液, Serva, Heidelberg) 至最终浓度为0.25% (w/v)。用5 N NaOH 将混悬液pH值调至10.0, 在 $0^\circ\text{C}$ 再搅拌2小时。用5 N HCl将pH值调至7.5后, 通过离心 $17000\times g$  (Beckmann J2-21离心机) 分离出菌体。平均萃取收率达 $\text{IFN}\alpha 2c$ 总量的 $29.3 \pm 5.9\%$ 。

### 实施例4: 层析纯化

#### 硅胶吸附层析:

将实施例3中的菌体微粒除去后, 将含有 $\text{IFN}\alpha$ 的上清液上硅胶柱 (Grace, 硅胶型号953W; 每ml柱材料含35 mg 蛋白, 流速25 ml/min), 该硅胶柱已用pH 7.5 的20 mM Tris-HCl饱和。该柱用30倍柱体积的起始缓冲液冲洗, 随后再用20 mM Tris-HCl, 100 mM 的氯化四甲基铵 (TMAC), pH 7.5 冲洗。通过增加TMAC的浓度至800 mM TMAC洗脱下 $\text{IFN}\alpha 2c$  (图3A)。

#### 疏水相互作用层析

从硅胶柱洗脱出的物质通过加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 将硫酸铵浓度调至

20% (w/v), 随后上苯基琼脂糖柱 (苯基toyopearl, 650S, Tosoh-aas), 该柱预先用20 mM Tris-HCl, 30% 硫酸胺饱和。IFN $\alpha$  2c用从100% 上样条件至100%的20 mM Tris-HCl, 30% 乙二醇, pH 7.5 的线性梯度洗脱, 流速为15 ml/min, IFN $\alpha$  2c的纯度是 $71 \pm 15\%$ 。

#### 阳离子交换层析

疏水相互作用层析的洗脱物通过全面透析至20 mM 琥珀酸钠, pH 5.0。在样品上磺丙基离子交换树脂前, 最终pH用HCl调至3.0, 该树脂(Toyopearl TSK SP 5PW, Tosohaas)预先用20 mM 琥珀酸钠, pH 5.0饱和。IFN $\alpha$  2c用从100%的上样条件至100%的20 mM 琥珀酸钠, 500 mM NaCl, 10% 乙二醇, pH 5.5 (溶剂B) 的线性梯度洗脱, 流速为6 ml/分。从该柱洗脱出的IFN $\alpha$  2c通常具有高于95%的纯度。

#### 阴离子交换层析

IFN $\alpha$  池用10 mM bisTris, pH 5.8 透析, 然后上DEAE琼脂糖柱(DEAE琼脂糖, FastFlow, Pharmacia), 该柱预先用相同的缓冲液饱和。用10 mM bisTris, 500 mM NaCl, 0.1% 吐温20, pH 5.8 (溶剂B) 的线性梯度洗脱IFN $\alpha$  2c, 流速为5 ml/分。

#### 实施例5: IFN $\alpha$ 2c制备物的分析

##### 反相HPLC

原IFN $\alpha$  2c在30°C用Baker Bond-WP-C18柱[250 $\times$ 4.5 mm, 颗粒大小5 $\mu$ m] 进行分析。使用 Merck Supersphere 120-4 C-18柱[125 $\times$ 4.5 mm, 颗粒大小4 $\mu$ m]在37°C分离胰蛋白肽。样品用溶剂A, 即0.1%的三氟醋酸水溶液和溶剂B即0.1%的三氟醋酸乙腈溶液及图中相关部分所述的梯度进行层析。



### SDS-聚酰胺凝胶电泳

IFN $\alpha$  2c样品在标准条件下在16% SDS聚酰胺凝胶上分析。电泳前，样品用二硫苏糖醇还原。蛋白带用考马斯亮蓝染色可见。

### 用ELISA定量IFN $\alpha$ 2c

纯化过程中得到的各种样品的IFN $\alpha$  2c的浓度通过Sandwich ELISA使用单克隆抗体OMG-2和MG-7 (Adolf等, 1990) 测定。

## 文献目录

- Adolf, G.R., *Virology* 175, 410-417 (1990)
- Bodo, G. & Maurer-Fogy, I., in: *The Biology of the Interferon System 1985* (Hrsg.: Stewart, W.E., II & Schellekens, H.), S. 59-64, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam (1985)
- Breitling R., Gerlach D., Hartmann M., Behnke D., *Mol. Gen. Genet.* 217, 384-391 (1989)
- Chang C.N., Kuang W.-J. and E.Y. Chen, *Gene* 44, 121-125 (1986)
- Dworkin-Rastl E., Swetly P., Dworkin M.B., *Gene* 21, 237-248 (1983)
- Fuh G., Mulkerrin M.G., Bass S., McFarland M., Brochier M., Bourell J.H., Light D.R., Wells J.A., *J. Biol. Chem.* 265, 3111-3115 (1990)
- Goeddel D.V., Yelverton E., Ullrich A., Heynecker H.L., Miozarri G., Holmes W., Seeburg P.H., Dull T., May L., Stebbing N., Crea R., Maeda S., McCandliss R., Sloma A., Tabor J.M., Gross M., Familletti P.C., Pestka S., *Nature* 287, 411-416 (1980)
- Goeddel D.V., Leung D.W., Dull T.J., Gross M., Lawn R.M., McCandliss R., Seeburg P.H., Ullrich A., Yelverton E., Gray P., *Nature* 290, 20-26 (1981)
- Hauptmann R. and P. Swetly, *Nucl. Acids Res.* 13, 4739-4749 (1985)
- Ho S.N., Hunt S.N., Horton R.M., Pullen J.K. and L.R. Pease, *Gene* 77, 51-59 (1989)
- Lee C.H., Mosely S.L., Moon H.W., Whipp S.C., Gyles C.L. and M. So, *Infection and Immunity* 42, 264-268 (1983)
- Mantei N., Schwarzstein M., Streuli M., Panem S., Nagata S., Weissmann C., *Gene* 10, 1-10 (1980)
- Picken R.N., Mazaitis A.J., Maas W.K., Rey M. and H. Heyneker, *Infection and Immunity* 42, 269-275 (1983)
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., "Molecular cloning - a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989)
- Shuttleworth M., Taylor J. and N. Minton, *Nucl. Acids Res.* 14, 8689 (1986)
- Streuli M., Nagata S., Weissmann C., *Science* 209, 1343-1347 (1980)
- Thatcher D.R., Panayotatos N., *Methods Enzymol.* 119, 166-177 (1986)
- Twigg A.J. and D. Sherratt, *Nature* 283, 216-218 (1980)

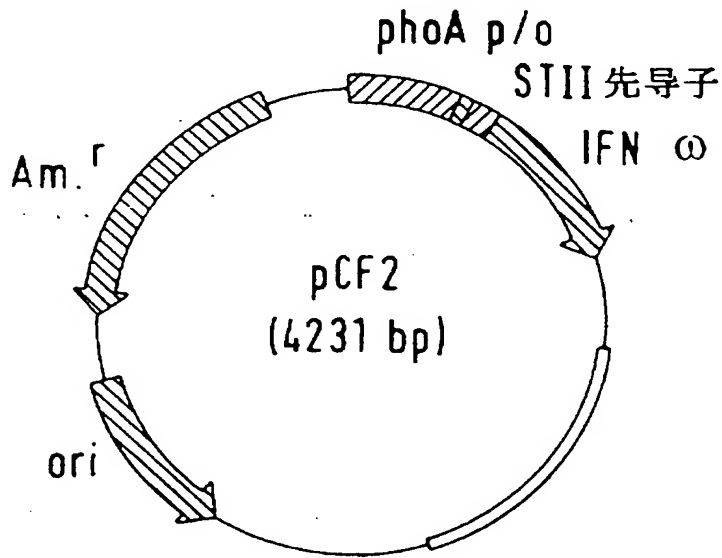


图 1A

图 2A

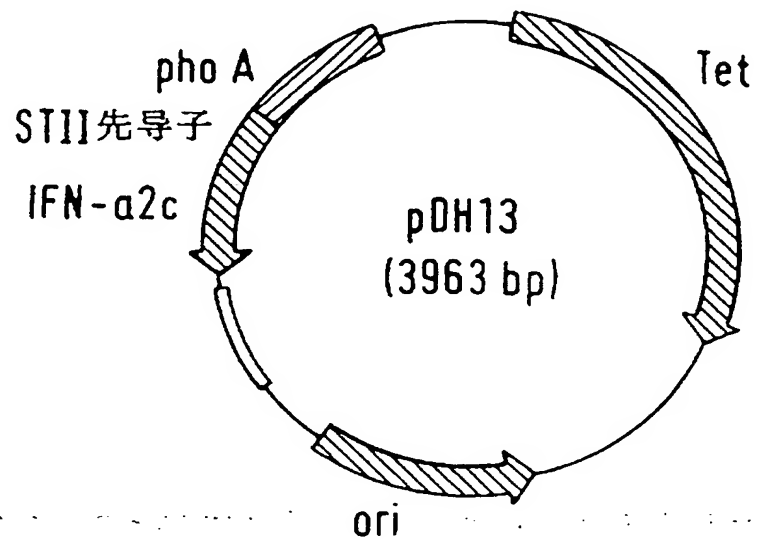


图 4

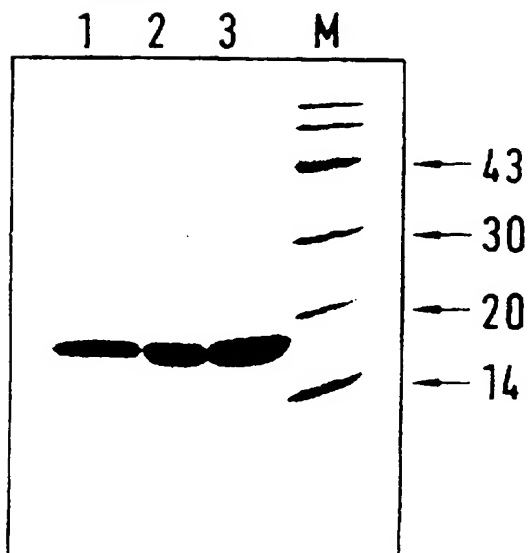


图 1B

gaattggagattatcgtcactgcaatgcttcgcaatatggcgcaaaatgaccaac	55
agcgggttgattgatcaggtagagggggcgctgtacgaggtaaagcccgatgccag	110
cattcctgacgaacgatacggagctgctgcgcgattacgtaaagaagttattgaag	165
catectcgtcagtaaaaagttaatcttttcaacagctgtcataaagttgtcacgg	220
ccgagacttatagtcgctttgtttttattttttaatgtatttgctcgagaggttg	275
aggtgattttt ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT	318
M K K N I A F L L A S	11
ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT	360
M F V F S I A T N A Y A C D	25
CTG CCT CAG AAC CAT GGC CTA CTT AGC AGG AAC ACC TTG GTG	402
L P Q N H G L L S R N T L V	39
CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT CTC	444
L L H Q M R R I S P F L C L	53
AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA	486
K D R R D F R F P Q E M V K	67
GGG AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT	528
G S Q L Q K A H V M S V L H	81
GAG ATG CTG CAG CAG ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC	570
E M L Q Q I F S L F H T E R	95
TCC TCT GCT GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC	612
S S A A W N M T L L D Q L H	109
ACT GGA CTT CAT CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG	654
T G L H Q Q L Q H L E T C L	123
CTG CAG GTA GTG GGA GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC	696
L Q V V G E G E S A G A I S	137
AGC CCT GCA CTG ACC TTG AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT	738
S P A L T L R R Y F Q G I R	151
GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA	780
V Y L K E K K Y S D C A W E	165
GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA TCC TTG TTC TTA TCA ACA	822
V V R M E I M K S L F L S T	179
AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA GAT AGA GAC CTG GGC	864
N M Q E R L R S K D R D L G	193
TCA TCT TGA aatgattctcattgattaatttgccatataacacttgcacatg	916
S S *	196
tgactctggtcaattcaaaagactcttattttcggttttaatcacagaattgactg	971
aattagttctgcaaatactttgtcggtatattaagccagtatatgttataaaagac	1026
ttaggttcaggggcatcagtccectaagatgttatttttactcattttattta	1081
ttcttacatttttatcatatttatactattttatattcttatataacaaatgtttgc	1136
ctttacattgtattaagataacaaaacatgttcaggatcc	1176

图 2B

EcoRI														
gaattcgagattatcgctcactgcaatgcttcgcaatatggcgcaaaatgaccaac														55
agcggttgattgatcaggtagagggggcgctgtacgaggtaaagcccgatgccag														110
cattcctgacgacgatacggagctgctgcgcgattacgtaaagaagttattgaag														165
catcctcgtcagtaaaaagttaatcttttcaacagctgtcataaagttgtcacgg														220
XhoI														
ccgagacttatagtcgctttgtttttattttttaatgtatttgctcgagaggttg														275
STII														
aggtgatttt														
ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT GCA TCT														318
M K K N I A F L L A S														11
IFN $\alpha$ 2c ->														
ATG TTC GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GCC TAT GCA TGT GAT														360
M F V F S I A T N A Y A C D														25
CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC TTG ATG														402
L P Q T H S L G S R R T L M														39
CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC TTG														444
L L A Q M R I S L F S C L														53
AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC														486
K D R R D F G F P O E E F G														67
AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG														528
N Q F Q K A E T I P V L H E														81
ATG ATC CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA														570
M I Q Q I F N L F S T K D S														95
TCT GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT														612
S A A W D E T L L D K F Y T														109
GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA														654
E L Y Q Q L N D L E A C V I														123
CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC														696
Q G V G V T E T P L M K E D														137
TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC														738
S I L A V R K Y F Q R I T L														151
TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT														780
Y L K E K K Y S P C A W E V														165
GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC														822
V R A E I M R S F S L S T N														179
PvuI PstI														
TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA tgataacgatcgtaactgc														868
L Q E S L R S K E														188
III														
agaagctt														876

图 3A

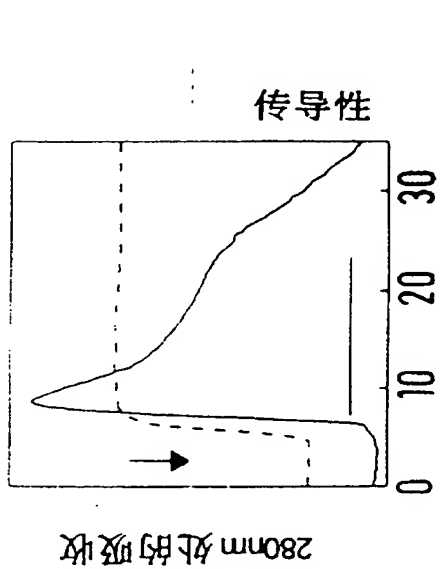


图 3B

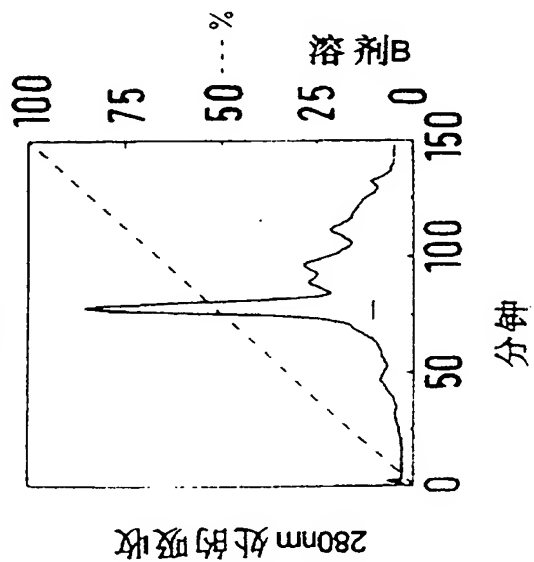


图 3C

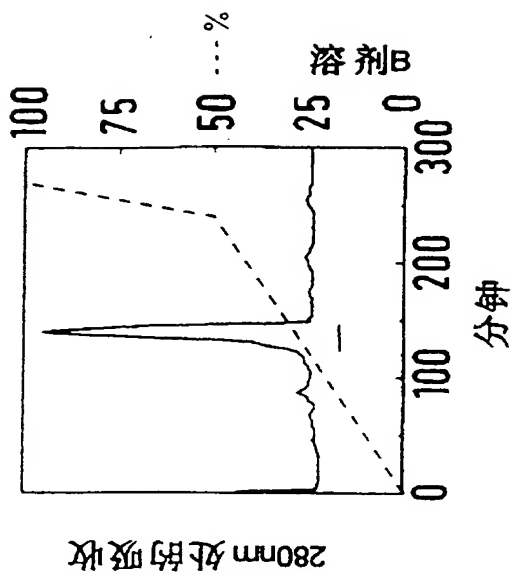


图 3D

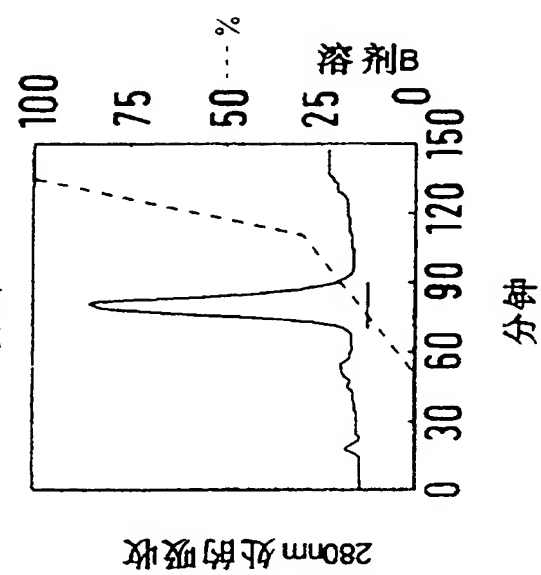


图 5A

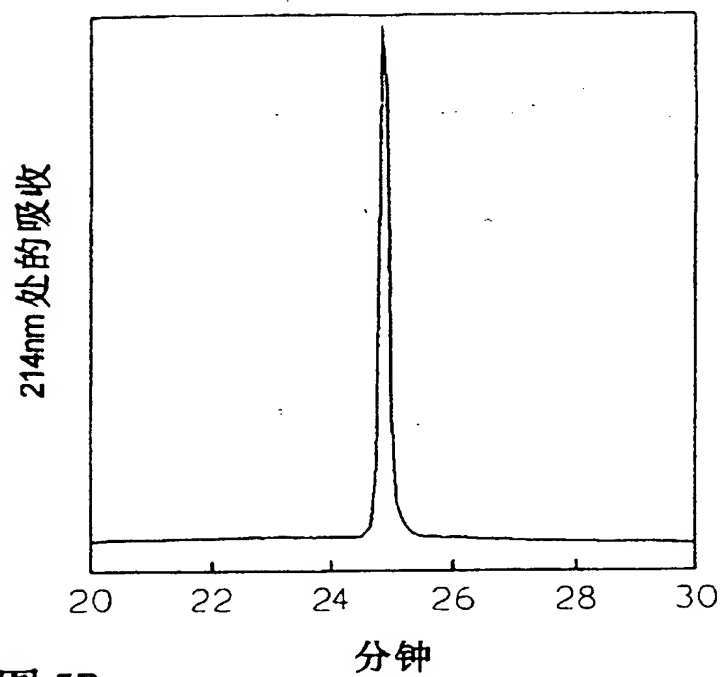


图 5B

